Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 43-56

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص.۵۶-۴۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Encapsulated Limonene based Multi-layer Electrostatic Adsorption and Evaluate Its Release under Simulated Oral Conditions

M. Khalilian-Movahhed[1], M. Mohebbi[2*], Ch. Sinding[3]

Received: 2021.09.02
Revised: 2021.11.11
Accepted: 2021.12.01
Available Online: 2021.12.01

How to cite this article:
Khalilian-Movahhed, M., Mohebi, M., & Sinding, Ch. (2023). Encapsulated limonene based multi-layer electrostatic adsorption and evaluate its release under simulated oral conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 19*(1): 43-56. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.72290.1090

Introduction

Efforts have always been made to protect valuable compounds of medicine, food and aromatics materials that are highly sensitive to environmental conditions by the encapsulation method. encapsulation of flavors, in addition to its protection, allows the aromatic substance to be released in a long time, and the time and place of its release can be controlled. To design these protection systems requires detailed information on encapsulation and release methods, the nature of walls and aromatic materials (Gunning *et al.*,1999). For encapsulation of sensitive compounds such as lipophilic materials, it is necessary to produce an emulsion of the desired substance in wall materials such as proteins, polysaccharides or a mixture of them. The important factors in encapsulation are the molecular weight, chemical properties and polarity of the core materials, the properties of the materials of the walls, and finally, the methods used to produce microcapsules. (Jafari *et al*., 2008).

The aim of this study was to produce and evaluate the properties of two and six layer multilayer microcapsules containing limonene using soy protein isolate and starch modified by spray drying. The release of encapsulated limonene was investigated under artificial oral conditions under different stress conditions. The results of this study can be used to predict the release rate of the encapsulated flavors and their release conditions.

Materials and Methods

Solution preparation: The solution of SPI (0-3%) was prepared by methods of Huang *et al*. (2012). The OSA starch stock solution (0-2%) was prepared by methods of Nilsson and Bergens (2007).

Emulsion's preparation: the primary emulsion of the optimum SPI and secondary emulsion of optimum OSA starch concentration prepared by the method of Noshad et al (2015).

Microcapsule production: To prepare the Microcapsules, a laboratory spray dryer was used. 180±5 °C, inlet air temperature, 25 (ml/min) feed rate, and 90±10 °C outlet air temperature were used. Six layer microcapsules was also prepared in the same conditions (Ansarifar *et al.*, 2017)

The micro structure, morphology and release of limonene were evaluated and finally by Zero order, First order, Higuchi, and Korsemeyer- peppas models were used to the fitting of experimental data.

Limonene release: To investigate the release of the encapsulated limonene, the release of these microcapsules (two and six layer) at 37 ° C and pH = 6.8, as well as frequent chewing (0, 50 and 100 rpm) were examined. For the apply of shear stress, an oral simulator was designed and developed by the Department of Food Science and Technology of Ferdowsi University of Mashhad was used.

---

1 and 2- Ph.D. Student and Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: m-mohebbi@um.ac.ir)
3- Assistant Professor, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRAE, Institut Agro, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72290.1090

Results and Discusion

The results of particle size changes of the initial emulsion formed with different levels of soy protein isolate showed that the particle size decreased with increasing the concentration of this protein to 1.5% and then it was increased. The results of zeta potential showed that with increasing the concentration of soy protein isolate to 1.5%, the zeta potential of the samples increased and with more than 1.5%, it did not have much effect on the zeta potential of the samples, which indicates that concentrate of 1.5% soy protein isolate has a good ability to cover surface of limonene particles. Similarly, 1.2% of OSA starch was determined for the secondary layer.

SEM images of the microcapsules showed that in the two-layer wall microcapsules have cavities, cracks and shrinkage. In the starting of drying, the rate of moisture lost is high and on the other hand, the wall is not strong enough to withstand the stresses caused by the exit of moisture from the walls, so the microcapsule has cavities. In six-layer microcapsules, a smooth, non-cracked surface was observed, which can be attributed to the wall strength due to the increase in the number of layers. Fourier transform infrared spectroscopic (FTIR) test showed that the outer surface of the microcapsules was covered by OSA starch in two and six layer microcapsules.

The release profile of encapsulated limonene showed that the release rate in two layer samples was faster than six layer samples. Also, with increasing shear rate, the amount of release increased. The results of experimental models fitting showed that the first-order model had the best description for releasing limonene from two- and six-layer samples in different conditions. Calculation of diffusion coefficient showed that six-layer microcapsules have a lower diffusion coefficient than two-layer microcapsules, which leads to a decrease in the release rate of limonene.

Conclusion

The results of this study showed that the layer-by-layer method could be used to produce limonene microcapsules. Soy protein isolate and modified starch can cover limonene droplets well. SEM images showed that the structure of six-layer microcapsules is free of cracks and cavities and has a more uniform surface than two-layer microcapsules. To investigate the mechanism of limonene release from two- and six-layer microcapsules, different kinetic models were used to fit the experimental release data. The results showed that the release of these microcapsules occurred based on the diffusion mechanism and Fick's law, which is the main mechanism of mass transfer in the release process. Also, the results showed that the six-layer microcapsules had a lower diffusion coefficient than the two-layer microcapsules and the release rate was lower in the two-layer microcapsule; This is due to the repetitive coating of soy protein isolate and modified starch around the microcapsules and the increase in wall thickness.

Keywords: Artificial mouth, Limonene, Multilayer microcapsules, Release

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص. ۵۶-۴۳

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 43-56

مقاله پژوهشی

ریز پوشانی چند لایه لیمونن بر پایه جذب الکترواستاتیک و ارزیابی رهایش آن تحت شرایط شبیه‌سازی‌شده دهان

محمد خلیلیان موحد[۱]- محبت محبی[۲]*- شارلوت سیندینگ[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

چکیده

در این پژوهش از روش جذب لایه‌به‌لایه پلی الکترولیت‌های ایزوله پروتئین سویا و نشاسته اصلاح‌شده برای تولید میکروکپسول محتوی لیمونن استفاده شد. ویژگی‌های مورفولوژیکی و ساختاری میکروکپسول‌های تولیدی بررسی گردید. میزان رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های تولید شده به‌صورت دو و شش لایه در شرایط دهان مصنوعی در شرایط تنش برشی مختلف (۰، ۵۰ و ۱۰۰ دور در دقیقه) مورد ارزیابی قرار گرفت. نمایه رهایش لیمونن از میکروکپسول‌ها نشان داد لیمونن در میکروکپسول‌های دو لایه با شیب بیشتری نسبت به شش لایه، رهایش یافته و سریع‌تر به حداکثر رهایش می‌رسد زیرا با افزایش تعداد لایه‌های دیواره، رهایش به تأخیر می‌افتد. نتایج به‌دست‌آمده از رهایش لیمونن از میکروکپسول‌ها نشان داد مدل درجه اول بهترین توصیف را از رهایش داشت و بر اساس معادله کورسمیر-پپاس رهایش لیمونن از میکروکپسول‌ها غالباً از نوع نفوذ بود. همچنین نتایج نشان داد ضریب نفوذ با افزایش تنش برشی، بیشتر شد و ضریب نفوذ در میکروکپسول‌های دو لایه نسبت به شش لایه بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: ریز پوشانی چندلایه، رهایش، دهان مصنوعی، لیمونن

مقدمه

همواره تلاش بر این بوده است تا ترکیبات ارزشمند دارویی، غذایی و مواد معطر که حساسیت بالایی نسبت به شرایط محیطی دارند با روش‌های مختلف ریز پوشانی و محافظت شوند. ریز پوشانی طعم‌ها علاوه بر محافظت آن، این امکان را فراهم می‌کند تا ماده معطر در زمان طولانی‌تری رهایش داشته باشد و زمان و محل رهایش آن قابل کنترل باشد. برای طراحی این سامانه‌های پوشش دهی نیازمند اطلاع دقیق از نحوه ریز پوشانی، رهایش، ماهیت مواد دیواره و مواد معطر است (Gunning *et al*., 1999).

در فرایند ریز پوشانی، ترکیبات فعال درون ماده حامل به دام می‌افتد؛ بدین طریق این ترکیبات فعال به‌صورت کنترل‌شده رهایش یافته و تحویل می‌گردد (Nedovic, Kalusevic, Manojlovic, Levic, and Bugarski, 2011). اهمیت این فرایند در صنعت غذا به قابلیت خوراکی بودن مواد تشکیل‌دهنده دیواره‌ها، قیمت پایین و در دسترس بودن آن برای واحدهای تولیدکننده است؛ لذا فرایند ریز پوشانی به آسانی قابلیت صنعتی شدن را دارد (Sagis *et al*., 2008). روش‌های متعددی برای فرایند ریز پوشانی قابل‌استفاده است که در این میان دچهر و هونگ در سال ۱۹۹۱ روشی به نام جذب سطحی لایه به لایه الکترواستاتیک[۴] را معرفی کردند که می‌تواند در صنعت به کار رود (GJDH Decher and Hong, 1991). این روش به دلیل فرایند ساده جذب و قابل‌کنترل بودن آن، یکی از روش‌های محبوب برای تولید کپسول‌های الکترولیت بوده و امکان تولید کپسول‌های در

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: m-mohebbi@um.ac.ir)
۳- استادیار، مرکز علوم طعم و غذا،اینرا، دانشگاه بورگوگن، دیژون، فرانسه

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72290.1090

4- Electrostatic layer-by-layer (LbL) adsorption

اندازه نانومتر تا میکرومتر را میسر می‌کند (Peyratout and Daehne, 2004; Yow and Routh, 2006; Sagis et al., 2008). در این تکنولوژی با تغییر تعداد لایه‌های دیواره‌ها و همچنین تغییر در ویژگی‌های مواد حامل و دیواره می‌توان نفوذپذیری و ویژگی‌های مکانیکی کپسول‌ها را کنترل کرد (Sagis et al., 2008). در روش جذب سطحی لایه به لایه، مواد تشکیل دهنده دیواره‌ها که دارای ماهیت پلی الکترولیت بوده به‌وسیله پیوندهای الکتروستاتیک روی یکدیگر متصل می‌شود و ایجاد کپسول را ایجاد می‌کنند (Gero Decher and Schlenoff, 2006; McClements, 2005).

برای ریز پوشانی ترکیبات حساس ازجمله مواد چربی‌دوست لازم است امولسیون ماده موردنظر در مواد دیواره مانند پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و یا مخلوطی از آن‌ها تولید شود. از جمله عوامل مؤثر در ریز پوشانی می‌توان وزن مولکولی، ویژگی‌های شیمیایی و قطبیت ماده مورد نظر برای ریز پوشانی و همچنین خصوصیات دیواره مورداستفاده و در نهایت فرایند مورداستفاده برای تولید میکروکپسول‌ها را نام برد (Jafari, Assadpoor, He, and Bhandari, 2008).

استفاده از پروتئین سویا به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا، ویژگی‌های عملکردی مناسب و هزینه پایین آن گسترش یافته است و یکی از مهم‌ترین منابع پروتئین در مصارف تجاری محسوب می‌شود. ایزوله پروتئین سویا علاوه بر ارزش بیولوژیکی آن به دلیلی ترکیب شیمیایی، انعطاف‌پذیری زنجیره‌های مولکولی و خواص آمفی فیلیکی، برای ایجاد پایداری امولسیون‌های غذایی استفاده می‌شود (Nesterenko, Alric, Silvestre, and Durrieu, 2012).

نشاسته اصلاح‌شده اکتنیل- سوکسینات (OSA[1]) با نام تجاری Hi-Cap 100، از استری شدن نشاسته و اسید اکتنیل سوکسنیک بدون آب در شرایط قلیایی تولید شده است که در این فرایند تعدادی زنجیره آب‌گریز به شاخه‌های آب‌دوست نشاسته اضافه شده، باعث خاصیت آب‌گریزی آن می‌شود (Tesch, Gerhards, and Schubert, 2002). خاصیت آب‌گریزی نشاسته اصلاح‌شده OSA باعث تضعیف پیوندهای درونی بین گرانول‌های آن می‌شود لذا حلالیت نشاسته در آب سرد افزایش و ویسکوزیته محلول آن کاهش می‌یابد.

ایزوله پروتئین سویا در pH های پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک (حدود ۴/۶) دارای بار مثبت است و در pH های بالاتر از این مقدار بار منفی دارد (Elzoghby, Samy, and Elgindy, 2012; Mendanha et al., 2009; Huang, Sun, Xiao, and Yang, 2012). نشاسته اکتنیل- سوکسینات حاوی بخشی از اسید کربوکسیلیک با بار منفی است که می‌تواند به سطوح با بار مثبت جذب شود. علاوه بر این به‌عنوان عاملی برای افزایش ویسکوزیته عمل کند. اما ظرفیت ایجاد قوام آن نسبت به سایر ماکرو مولکول‌هایی که برای افزایش ویسکوزیته استفاده می‌شوند بسیار محدود است. بااین‌حال به علت خصوصیات امولسیون کنندگی و ایجاد ویسکوزیته، نشاسته اکتنیل- سوکسینات باعث کاهش هزینه‌ها به دلیل نیاز کمتر به استفاده از ترکیبات پایدارکننده در محصولات مختلف می‌شود (Dokić, Krstonošić, and Nikolić, 2012; Nilsson and Bergenståhl, 2007; Tesch et al., 2002).

در بین روش‌های خشک‌کردن، فرایند خشک‌کردن افشانه‌ای، مواد فرار بیشتری را در داخل کپسول نگهداری می‌نماید. مایع اولیه تزریق‌شده در خشک‌کن افشانه‌ای می‌تواند به‌صورت امولسیون، محلول یا سوسپانسیون باشد. روش خشک‌کردن افشانه‌ای یکی از رایج‌ترین و متداول‌ترین روش‌های ریز پوشانی است. به‌طورکلی مواد معطر با فراریت و قطبیت کمتر و وزن مولکولی بالاتر، ماندگاری بیشتری در کپسول‌های حاصل از خشک‌کن افشانه‌ای دارند (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, and Saurel, 2007).

بررسی ویژگی‌های انتقال جرم و محاسبه ضریب نفوذ ماده ریز پوشانی شده برای پیش‌بینی رهایش و برازش داده‌های آزمایشگاهی با مدل‌های ریاضی اهمیت بالایی برای مدل‌سازی رهایش و طراحی سیستم‌های ریز پوشانی دارد که می‌تواند منجر به کنترل رهایش و رسیدن به‌سرعت مطلوب آن گردد (Zuidam and Nedovic, 2010)؛ لذا از جمله اهداف این پژوهش بررسی و برازش مدل‌های رهایش برای معرفی بهترین شرایط رهایش نمونه‌های حاوی لیمونن است.

انصاری فر و همکاران (Ansarifar et al., 2017) در مطالعه‌ای از فیبریل استخراجی از پروتئین سویا و پکتین با درجه متوکسیل بالا به‌صورت لایه‌های متناوب و روش درون‌پوشانی چندلایه برای ریز پوشانی لیمونن و دی استیل استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد علاوه بر کارایی بالای این روش درون‌پوشانی، با افزایش لایه‌های استفاده شده، ضریب نفوذ کاهش‌یافته و سرعت رهایش طعم‌های مورداستفاده کم می‌شود (Ansarifar, Mohebbi et al., 2017).

نوشاد و همکاران (Noshad et al., 2015) از روش انکپسولاسیون لایه به لایه با استفاده از ایزوله پروتئین سویا، نشاسته و کیتوزان برای درون‌پوشانی وانیلین استفاده کردند. نتایج آن‌ها به‌خوبی نشان داد که این روش درون‌پوشانی به‌خوبی باعث افزایش زمان رهایش کامل وانیلین کپسوله شده می‌شود. همچنین آن‌ها در تحقیق دیگری در مقایسه ضریب نفوذ وانیلین رهایش شده از

1- Starch octenyl succinate

کپسول‌های یک و دو لایه نشان دادند میکروکپسول‌های یک لایه نسبت به میکروکپسول‌های دو لایه دارای ضریب نفوذ بیشتری هستند (Mohebbi, Varidi, Noshad, and Khalilian Noshad *et al*., 2015;Movahhed, 2019;).

سایر پژوهشگران نیز گزارش کردند که در میکرو کپسول‌های چندلایهٔ آلژینات/کیتوزان (Ye, Wang, Liu, and Tong, 2005) و یا برای میکروکپسول‌های چندلایهٔ پلی‌استایرن سولفانات/پلی‌آلیلامین هیدروکلرید[1] (Qiu, Leporatti, Donath, and Möhwald, 2001) با افزایش تعداد لایه‌های دیواره‌ها، ضریب نفوذ ماده ریز پوشانی شده کاهش یافت.

هدف از این تحقیق امکان تولید و ارزیابی ویژگی‌های میکروکپسول‌های چند لایه ۲ و ۶ لایه ایزوله پروتئین سویا و نشاسته اصلاح‌شده به کمک خشک‌کن پاششی و بررسی رهایش لیمونن ریز پوشانی شده در این میکروکپسول‌ها در شرایط دهان مصنوعی تحت شرایط تنشی مختلف است. نتایج این پژوهش می‌تواند برای پیش‌بینی میزان رهایش طعم‌های درون‌پوشانی شده و شرایط رهایش آن‌ها استفاده شود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

ایزوله پروتئین سویا با ۹۴ درصد پروتئین از شرکت به پارس، نشاسته اصلاح‌شده (ذرت با استخلاف‌های اکتنیل سوکسینات[2]) از شرکت National Starch، لیمونن (R) -(+)- limonene 97%) از شرکت Sigma Aldrich، فسفات دی هیدروژن پتاسیم (KH_2PO_4)، هیدروکسید سدیم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم (K_2HPO_4) و آنزیم آلفا–آمیلاز با درجهٔ خلوص حداقل ۹۹ درصد از شرکت Merck آلمان، اسید هیدروکلریدریک ۳۷ درصد، کلرید سدیم (NaCl)، بیکربنات سدیم ($NaHCO_3$) و کلرید کلسیم از شرکت Sigma تهیه شدند.

تهیه سوسپانسیون

پروتئین ایزوله سویا (۳–۰ درصد) در بافر استات ۵ میلی مولار به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تحت تأثیر امواج فراصوت (سیستم حمام Schaper model Unique USC 25 kHz) قرار گرفت. در نهایت دیسپرسیون حاصل در ۵۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای ایجاد حداکثر آب پوشی توسط پروتئین‌ها، محلول نهایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد (Huang *et al*., 2012).

برای تهیه نشاسته، ابتدا مقادیر مورد نظر نشاسته اصلاح‌شده (۲–۰ درصد) در بافر استات ۵ میلی مولار حل شده به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به هم زده شد، سپس تا دمای اتاق سرد کرده و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد تا جذب آب کامل انجام شود (Nilsson and Bergenståhl, 2007). از آب دیونیزه برای تهیه دیسپرسیون ایزوله پروتئین سویا و نشاسته استفاده شد.

تهیه امولسیون

برای تهیه امولسیون ابتدا ۱ درصد (وزنی/حجمی) لیمونن با سوسپانسیون ایزوله پروتئین سویا آبپوشی شده در pH =۳/۵ که با محلول اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال و هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال تنظیم شده بود، مخلوط شد و برای مدت ۲ دقیقه هموژنیزاسیون توسط هموژنایزر (IKA-T50، آلمان) با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق انجام شد. برای همگن‌سازی ثانویه از پروب اولتراسوند (مدل VCX750، شرکت Sonics & Material، امریکا) با بیشینه توان اسمی ۷۵۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۲ دقیقه استفاده شد. دمای نمونه‌ها در طول فرایند با چرخش آب سرد در حدود ۲۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. جداسازی سرم از ذرات امولسیون توسط سانتریفیوژ کردن در دو مرحله انجام شد: مرحله اول به مدت ۴۵ دقیقه در ۵۰×g و مرحله دوم برای ۱ دقیقه ۷۵۰×g در دمای محیط (۲۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. ۲ درصد (وزنی/حجمی) از ذرات امولسیون جدا شده به محلول بعدی، نشاسته آبپوشی شده (لایه زوج) و یا محلول ایزوله پروتئین سویا (لایه فرد) در pH=۳/۵ اضافه شد. برای هر لایه روش فوق تکرار شد (Ansarifar, Mohebbi, *et al*., 2017).

تهیه میکروکپسول

برای تهیه میکروکپسول‌ها از خشک‌کن پاششی آزمایشگاهی (Mini Spray Dryer،Buchi، سوئیس) استفاده شد. شرایط خشک‌کردن شامل دمای هوای ورودی ۵±۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت پمپ خوراک ورودی ۲۵ میلی‌لیتر و دمای هوای خروجی ۱۰±۹۰ درجه سانتی‌گراد طبق روش انصاری فر و همکاران (Ansarifar *et al*., 2017) در نظر گرفته شد. جهت جلوگیری از جذب رطوبت، پودرهای تولیدی سریعاً در ظرف شیشه‌ای منتقل شده در دسیکاتور نگهداری شد.

تعیین بار الکتریکی ذرات

اندازه‌گیری بار الکتریکی ذرات امولسیون بر اساس سنجش جابجایی الکتروفورتیک ذرات با دستگاه زتا سایزر (Nano-ZS,

---

1- Polystyrene sulfonate/polyallylamine hydrochloride
2- Octenyl Succinic Anhydride

Malvern، انگلیس) انجام شد. برای هر نمونه سه بار اندازه‌گیری انجام شد (Ansarifar *et al.*, 2017).

اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات نمونه‌ها به کمک دستگاه انکسار نور لیزر (Fritsch Analysette 22، آلمان) اندازه‌گیری شد. نمونه امولسیون قطره‌قطره به درون مخزن آب دستگاه اضافه شد تا ذرات امولسیون به محدوده انسداد نوری قابل قبول توسط دستگاه برسد. پس‌ازآن ذرات به محفظه عبور نور لیزر منتقل شده توزیع اندازه ذرات از روی میزان پراکنش نور بر حسب مدل لورنزمی و نظریه فرانهوفر تعیین شد (Ansarifar *et al.*, 2017).

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی

توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (Axford,S-360، انگلیس) ساختار میکروکپسول‌های تولیدی مشاهده شد. نمونه‌ها با استفاده از چسب نقره روی تیغه آلومینیومی چسبانده و توسط یک لایه نازک جنس طلا پوشانده شد. نمونه‌ها سپس در اتاقک تحت خلأ قرار گرفتند. الکترون‌های پرشتاب با ولتاژ بالا (۲۰ کیلوولت) به سطح ذرات ثابت‌شده تابیده شد و بر با توجه شعاع الکترونی برگشتی از سطح، تصاویر به دست آمد.

آزمون طیف سنجی انتقال فوریه مادون‌قرمز

گروه‌های ساختاری ترکیبات مورداستفاده در دیواره‌ها و برهم‌کنش‌های بین آن‌ها با آزمون طیف سنجی انتقال فوریه مادون‌قرمز (FTIR[1]) ارزیابی شد. ۲ میلی‌گرم از پودر امولسیون‌های خشک‌شده بین ۲۰۰ میلی‌گرم قرص‌های برمید پتاسیم فشرده شد و طیف‌های آن‌ها با دستگاه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (Shimadzu 6650, Japan) در محدوده cm^{-1} ۴۰۰–۴۰۰۰ اندازه گیری شدند (Noshad *et al.*, 2015).

راندمان ریز پوشانی

راندمان ریز پوشانی، با اندازه‌گیری مقدار لیمونن در پودر تولیدی و مقدار اولیه آن در امولسیون مطابق رابطه ۱ محاسبه شد:

۱۰۰× (لیمونن در امولسیون اولیه (گرم)/مقدار لیمونن در پودر (گرم))=راندمان ریز پوشانی رابطه (۱)

برای اندازه گیری لیمونن موجود در میکروکپسول‌ها، یک گرم از پودر تولیدی را با ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به داخل لوله آزمایش با درب پیچی ریخته و به مدت یک دقیقه با شیکر لوله (ZX3, velp scientifica, Italy) هم زده شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر هگزان به آن اضافه گردید و مجدد به مدت یک دقیقه با شیکر لوله هم زده شد. لوله آزمایش را در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه داخل حمام آب گرم گذاشته و هم می‌زنیم. سپس در دمای اتاق سرد شد و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد تا حلال جدا گردد. مقدار جذب لیمونن رهایش یافته در طول‌موج ۲۵۲ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت و ثبت گردید (Soottitantawat, Yoshii, Furuta, Ohkawara, and Linko, 2003). منحنی کالیبراسیون با استفاده از لیمونن و هگزان رسم شد و از حلال هگزان به‌عنوان شاهد بدون لیمونن برای صفر کردن دستگاه استفاده گردید.

بررسی رهایش لیمونن

برای ارزیابی نحوه رهایش لیمونن درون‌پوشانی شده، رهایش میکروکپسول‌های دو و شش لایه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد (دمای معادل بدن) و تنش برشی دهان شامل: ۰، ۵۰ و ۱۰۰ دور در دقیقه و مدت ۷ دقیقه موردبررسی قرار گرفت. برای اعمال تنش برشی از دستگاه شبیه‌ساز دهان طراحی شده توسط گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، استفاده شد. تنظیم pH روی ۶/۸ با استفاده از محلول‌های ۰/۱ نرمال اسیدکلریدریک و هیدروکسید سدیم صورت گرفت. تولید بزاق با استفاده از روش Zandi و همکاران (۲۰۱۴) انجام گردید.

بررسی رهایش لیمونن درون‌پوشانی شده از میکروکپسول‌های دو و شش لایهٔ تولیدی در شرایط دهانی انجام پذیرفت. میزان رهایش در حضور بزاق مصنوعی تولیدشده، در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و در تنش برشی ۰، ۵۰ و ۱۰۰ معکوس ثانیه انجام شد. نسبت بزاق مصنوعی به میکروکپسول بر اساس پژوهش زندی و همکاران (Zandi *et al.*, 2014) تعیین شد، به‌نحوی‌که میکروکپسول‌ها با بزاق به نسبت ۴ به ۱ مخلوط و رهایش بررسی شد (Zandi *et al.*, 2014).

برای رسم پروفایل رهایش لیمونن در بزاق، در بازه‌های زمانی معین مقدار ۱ میلی‌لیتر از نمونه با استفاده از سرنگ از مخزن دهان مصنوعی برداشته و از کاغذ واتمن با شماره ۱، صاف شد تا دیواره‌ها و ذرات میکروکپسول رهایش نیافته از محیط جدا گردند. در نهایت نمونه خارج شده از کاغذ صافی برای اندازه‌گیری میزان لیمونن موجود در آن از روش طیف‌سنج مرئی–فرابنفش و طول‌موج ۲۵۲ نانومتر استفاده شد (Rodríguez, Wilderjans, Sosa, & Bernik, 2013).

1- Fourier- transform infrared spectroscopy

مدل‌سازی رهایش لیمونن

برای بررسی رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه و ارزیابی سرعت رهایش آن، از مدل‌های مختلفی شامل معادلهٔ درجهٔ صفر[1] (رابطه ۲)، درجه اول[2] (رابطه ۳)، کورسمیر–پپاس[3] (رابطه ۴) و هیگوچی[4] (رابطه ۵) استفاده شد (Dash, Murthy, Nath, & Chowdhury, 2010).

رابطهٔ (۲) $C = K_0 t$

رابطهٔ (۳) $\ln M_t = \ln M_0 - K_1 \times t$

رابطهٔ (۴) $C = K_{KP} t^n$

رابطهٔ (۵) $C = K_H t^{0.5}$

در این روابط C غلظت لیمونن آزادشده در زمان t، n توصیف‌کننده فرایند رهایش و K_0 ثابت کینتیکی برای معادله درجه صفر، K_1 ثابت معادله درجه اول، K_{KP} ثابت کورسمیر–پپاس و K_H ثابت هیگوچی بوده، پارامتر n مشخص‌کننده مکانیسم‌های مختلف رهایش است.

برای محاسبه ضریب نفوذ از مدل تجربی معرفی‌شده توسط سیپمان و سیپمان (Siepmann and Siepmann, 2008) که برآمده از قانون فیک است، استفاده شد. این قانون برای ذرات کروی که تحت فرایندهایی با مدت زمان کوتاه قرار می‌گیرند و شرایطی که مقدار رهایش کمتر از ۴۰ درصد باشد، استفاده شد:

رابطهٔ (۶) $\frac{M_t}{M_0} = 6\left(\frac{Dt}{\pi R^2}\right)^{\frac{1}{2}} - \frac{3Dt}{R^2} \quad \frac{M_t}{M_0} < 0.4$

در رابطهٔ (۶)، t زمان رهایش (ثانیه)، D ضریب نفوذ (مترمربع بر ثانیه)، M_t و M_0 به ترتیب مقدار لیمونن آزادشده در زمان t و صفر و R بیانگر شعاع میکروکپسول است که شعاع میکروکپسول دو لایه ۵/۶ میکرون و شعاع میکروکپسول شش لایه ۶/۷ میکرون توسط دستگاه انکسار نور لیزر (مدل SALD-2101، Shimadzu، ساخت ژاپن) اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری و برازش نتایج

از طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی برای آنالیز آماری داده‌ها استفاده شد. کلیه آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد. از آزمون دانکن برای تعیین اختلاف بین میانگین اعداد استفاده گردید.

برازش داده‌های آزمایشگاهی حاصل از رهایش لیمونن با استفاده از معادله‌های تجربی و به کمک نرم‌افزار متلب (نسخهٔ 2016 a) صورت گرفت و بر اساس بالاترین ضریب همبستگی، بهترین مدل انتخاب و پیشنهاد شد. از نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۱۹ برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج و بحث

تهیه امولسیون اولیه و ثانویه

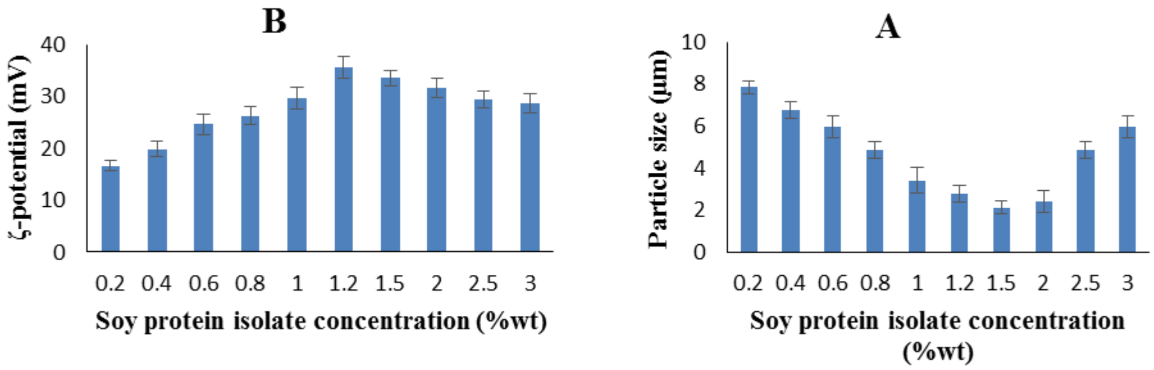
اندازه ذرات امولسیون از مهم‌ترین ویژگی‌های هر امولسیون بوده که هر چه کوچک‌تر باشد پایداری بیشتری برخوردار است. هرچه پتانسیل زتا امولسیون بیشتر باشد به دلیل افزایش نیروهای دافعه الکتروستاتیک و هیدراسیونی، پایداری امولسیون بیشتر می‌شود (Güzey and McClements, 2006). از متغیرهای اندازه ذرات و پتانسیل زتا برای انتخاب مقدار بهینه ایزوله پروتئین سویا جهت تشکیل امولسیون اولیه پایدار استفاده شد.

نتایج بررسی تغییرات اندازه قطرات در سطوح مختلف غلظت ایزوله پروتئین سویا نشان داد که با افزایش غلظت این پروتئین تا ۱/۵ درصد اندازه ذرات تشکیل‌شده کاهش یافت. افزایش غلظت ایزوله پروتئین سویا از ۱/۵ تا ۲ درصد تغییر محسوسی بر اندازه ذرات نداشت اما با افزایش غلظت ایزوله پروتئین تا ۳ درصد، اندازه ذرات افزایش یافت (شکل 1A).

طی فرایند هموژن کردن، ذرات بزرگ امولسیون شکسته و باعث تولید ذرات کوچک‌تر می‌شود لذا سطح و تعداد ذرات امولسیون افزایش می‌یابد. اگر ایزوله پروتئین سویا در این حین به مقدار کافی موجود نباشد، سطح مشترک بین هسته و آب به‌صورت کامل پوشش داده نشده لذا ذرات کوچک تولید شده از طریق تشکیل پل عرضی و یا تشکیل خوشه به هم متصل می‌شوند. در نتیجه اندازه ذرات افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش مقدار ایزوله پروتئین سویا در محیط امولسیون، پدیده فلوکوله شدن ناقص و درهم‌آمیختگی ذرات اتفاق افتاده و باعث افزایش اندازه ذرات امولسیون می‌شود. لذا برای ایجاد پایداری مناسب، غلظت ایزوله پروتئین سویا باید به‌صورت بهینه استفاده شود تا تمام سطح مشترک لیمونن- آب را بپوشاند.

محبی و همکاران (Mohebbi *et al.*, 2019) نشان دادند با افزایش پروتئین سویا تا ۱ درصد، اندازه میانگین ذرات امولسیون کاهش معنی‌داری داشت و بعدازآن با افزایش میزان پروتئین سویا، اندازه ذرات درشت‌تر شدند. کوردیگ و روزچ (Corredig and Roesch, 2002) نتایج مشابهی را گزارش دادند؛ آن‌ها نشان دادند که میانگین اندازه قطرات امولسیون‌ها، با افزایش غلظت پروتئین سویا، کاهش معنی‌داری داشت و سپس از یک غلظت مشخص به بعد با افزایش آن، اندازه قطرات امولسیون تقریباً ثابت باقی ماند.

1- zero-order
2- First order model
3- Korsemeyer –Peppas
4- Higuchi

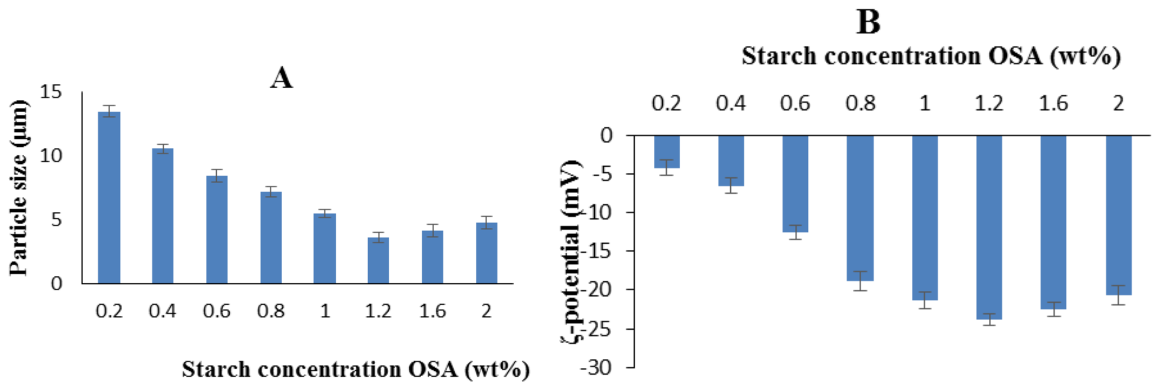


شکل ۱- تأثیر غلظت ایزوله پروتئین سویا بر A: اندازه ذرات امولسیون اولیه و B: پتانسیل زتا امولسیون اولیه

Fig. 1- Effect of soy protein isolate concentration on A: particle size and B: zeta potential of initial emulsion

نتایج پتانسیل زتا نشان می‌دهد که سطح قطرات امولسیون اولیه دارای بار الکتریکی مثبت بوده با توجه به pH نمونه‌ها (pH = ۳/۵) و نقطه ایزوالکتریک ایزوله پروتئین سویا (pH = ۴/۶) قابل انتظار است. تغییرات پتانسیل زتای نمونه‌ها با افزایش غلظت ایزوله پروتئین سویا تا ۱/۵ درصد، افزایشی بوده و بعدازآن تغییرات محسوسی مشاهده نشد لذا غلظت ۱/۵ درصد ایزوله پروتئین سویا بیشترین توانایی را در پوشش دهی سطح مشترک ذرات لیمونن- آب را دارد (شکل ۱B).

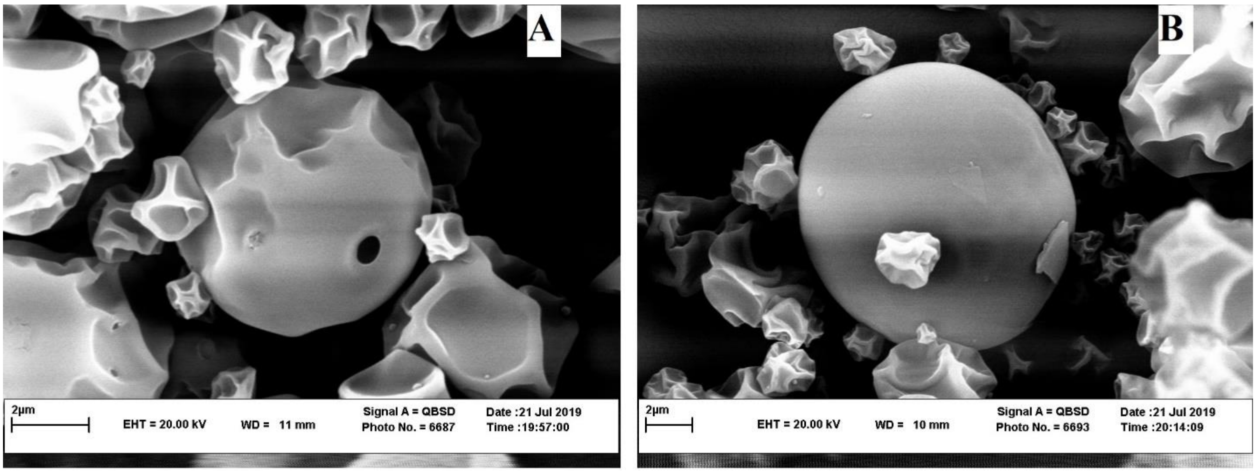
برای تولید امولسیون با لایه دوم، از نشاسته اصلاح‌شده در غلظت‌های مختلف (۲- ۰ درصد) استفاده و به امولسیون اولیه که به‌وسیله غلظت ۱/۵ درصد ایزوله پروتئین سویا پایدار شده بود، اضافه شد. بهینه یابی غلظت نشاسته اصلاح‌شده با اندازه‌گیری اندازه ذرات امولسیون دوم و پتانسیل زتا انجام شد. بررسی تغییرات اندازه ذرات امولسیون ثانویه در مقادیر مختلف نشاسته اصلاح‌شده نشان داد که با افزایش غلظت نشاسته تا ۱/۲ درصد، کاهش معنی‌داری در قطر ذرات مشاهده شد؛ همچنین افزایش آن تا ۲ درصد تأثیری بر اندازه ذرات ندارد که این امر به این دلیل است که غلظت ۱/۲ درصد نشاسته اصلاح‌شده بالاترین توانایی پوشش دهی قطرات ذرات و پایداری آن‌ها بعد از تشکیل امولسیون دوم را دارد (شکل ۲A).



شکل ۲- تأثیر غلظت نشاسته اصلاح‌شده بر A: اندازه ذرات و B: پتانسیل زتا امولسیون دوم

Fig. 2- Effect of modified starch concentration on A: particle size and B: zeta potential of the second emulsion

مقدار پتانسیل زتا در شرایط استفاده از غلظت‌های مختلف نشاسته اصلاح‌شده در شکل ۲B، آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ذرات امولسیون دوم دارای بار الکتریکی منفی بوده که به دلیل نوع استخلاف‌های زنجیره پلی ساکاریدی (بنیان‌های انهیدرو اکتنیل سوکسینات) موجود در مولکول‌های نشاسته است. با افزایش غلظت نشاسته اصلاح‌شده تا ۱/۲ درصد بار الکتریکی سطح ذرات مقدار منفی بزرگتری می‌شود که به علت اثر پوشش دهی زنجیرهای نشاسته است و سطح اطراف مولکول‌های پروتئین سویا (لایه اولیه) را احاطه می‌کند. نوشاد و همکاران (Noshad *et al.*, 2016) برای میکروکپسولاسیون وانیلین، مقادیر ۱ درصد ایزوله پروتئین سویا و ۰/۸ درصد نشاسته را به‌عنوان شرایط بهینه برای پوشش دهی لایه های اولیه و ثانویه، گزارش کردند (Noshad *et al*., 2016).



شکل ۳- تصاویر SEM میکروکپسول‌های چند لایه؛ A: دو لایه و B: شش لایه

Fig. 3- SEM images of multilayered microcapsules; A: two layers and B: six layers

میکروسکوپ الکترونی روبشی

از تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM[1]) برای بررسی ویژگی‌های مورفولوژی نظیر شکل ظاهری و اندازه میکروکپسول‌های دو و شش لایه تهیه شده با امولسیون‌های چند لایه، استفاده شد. تصاویر SEM میکرو کپسول‌های با تعداد لایه‌های ۲ و ۶ لایه در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که در شکل ۳A (مربوط به میکروکپسول با دو لایه) مشاهده می‌شود دیواره دارای حفره، ترک‌خوردگی و چروکیدگی است. در مراحل اولیه خشک‌کردن، سرعت خروج رطوبت بالا بوده و از طرفی دیواره از استحکام کافی برای تحمل تنش‌های ناشی از خروج رطوبت از دیواره‌ها نبوده لذا میکروکپسول دارای حفرات است (Sagis *et al*., 2008).

همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، میکروکپسول‌های شکل ۳B (میکروکپسول با دیواره شش لایه) سطحی صاف، فاقد حفرات و ترک‌خوردگی داشت که علت آن استحکام دیواره‌ها به دلیل افزایش تعداد لایه‌ها است. هومبولت هوا و همکاران (Humblet-Hua *et al*., 2011) و انصاری فر و همکاران (Ansarifar *et al*., 2017) نشان دادند تمایل به چروکیدگی و ترک‌خوردگی در میکرو کپسول‌های با لایه‌های کمتر، بسیار زیاد بوده اما با افزایش تعداد لایه‌های میکرو کپسول‌ها، شکل آن‌ها کروی و ساختار دیواره صاف و یکنواخت‌تر می‌شود.

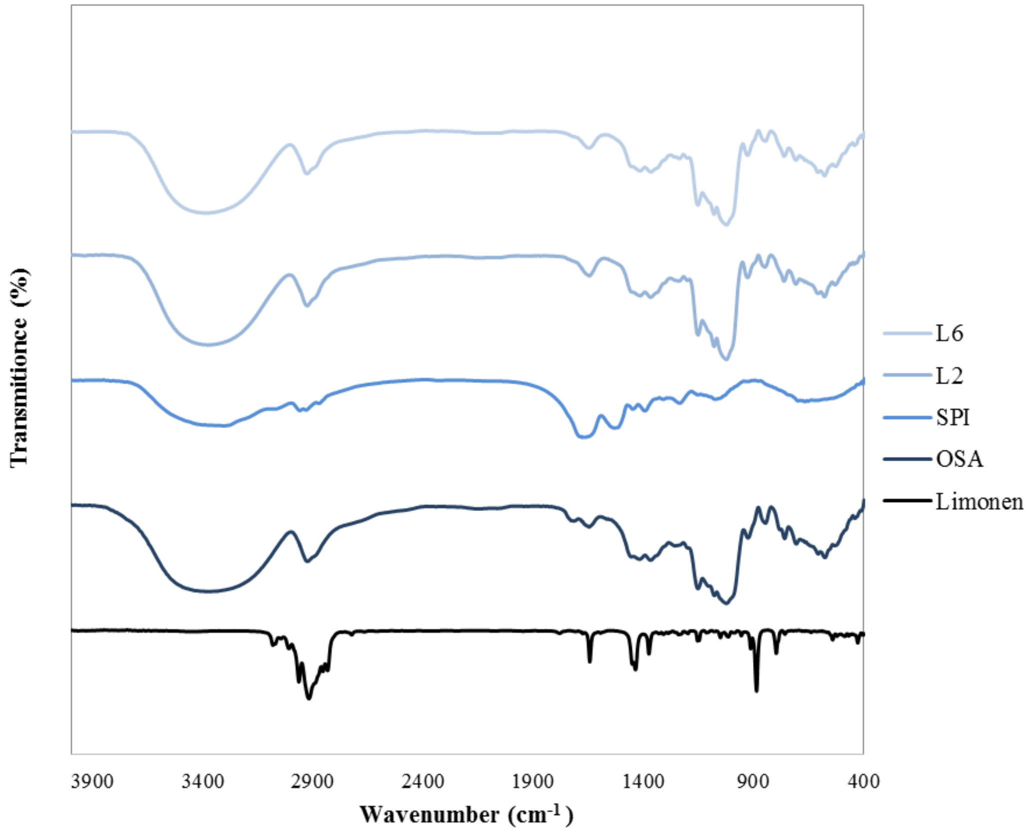
آزمون طیف سنجی انتقال فوریه مادون قرمز

جهت تعیین ساختار میکرو کپسول‌های تولیدی، آزمون FTIR انجام شد. طیف مادون قرمز میکروکپسول‌های دو و شش لایه و مواد اولیه بکار رفته در دیواره در ناحیه $4000-500\ cm^{-1}$ در دمای اتاق (۲۵°C) ثبت شد (شکل ۴). برای نمونه لیمون، پیک‌های ناحیه cm^{-1} ۱۳۷۵ (CH_3 خمشی)، cm^{-1}۱۴۳۷ (CH_2 خمشی)، cm^{-1} ۱۶۴۴ (C= C)، cm^{-1} ۲۸۳۵ تا ۲۹۶۵ (C-H آلیفاتیک کششی) وcm^{-1} ۳۰۸۳ (C-H هیبریداسیون sp^2) قابل‌مشاهده است. پیک محدوده ۳۴۰۰ مربوط به گروه‌های آزاد پیوند شده N-H و O-H است. پیک‌های موجود در حدود ۱۶۵۰، ۱۵۳۷ و ۱۲۴۰ به ترتیب متعلق هستند به C=O نوسان کششی (آمید I)، N-H نوسان خمش (آمید II) و N-H در سطح و C-N نوسان کششی (آمید III) (Wang *et al*., 2011). در طیف نشاسته اصلاح‌شده، عدد مربوط به موج cm^{-1} ۳۰۰۰- ۲۸۰۰ مشخصه پیوندهای C-H گروه‌های متیل است و نوار عریض که مرکز آن حدود cm^{-1} ۳۳۸۷ بوده، به علت حضور گروه‌های هیدروکسیل است. همچنین پیک‌های متعددی نیز در این ناحیه طیف نشاسته اصلاح‌شده وجود دارند که نشان‌دهنده حضور پیوندهای کششی C=O و C-N است. پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} ۱۲۰۰ -۹۰۰، ارتعاشات متعدد پیوندهای C-O-H و C-O-C گلیکوزیدی را نشان می‌دهد (Luo, Huang, Fu, Zhang, and Yu, 2009).

سطح خارجی ذرات ریز پوشانی شده دو لایه نشاسته اصلاح‌شده است همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود پیک محدوده cm^{-1} ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ نسبت به ایزوله پروتئین سویا تیزتر و بزرگ‌تر شده است. تیز شدن پیک در این منطقه نشان‌دهنده تشکیل پیوندهای هیدروژنی را بیان می‌کند. همچنین پیک‌های مربوط به ویژگی‌های پروتئین در نواحی cm^{-1} ۱۶۵۴ که نشان‌دهنده پیوندهای کششی C=O است، حفظ شده‌اند. بررسی پیک‌ها نشان داد لیمون باعث کاهش یک واحدی در ناحیه های ۱۴۱۸، ۱۶۲۷ و cm^{-1} ۲۹۲۷ شده است.

1- Scanning electron microscope

بررسی پیک‌های نمونه‌های با شش لایه نشان داد که تقریباً از همه پیک‌ها و سطح زیر نمودار کاسته شده است که به دلیل افزوده شدن لایه‌های ایزوله پروتئین سویا بود و تأثیر آن بر پیک‌های لایه ششم است.



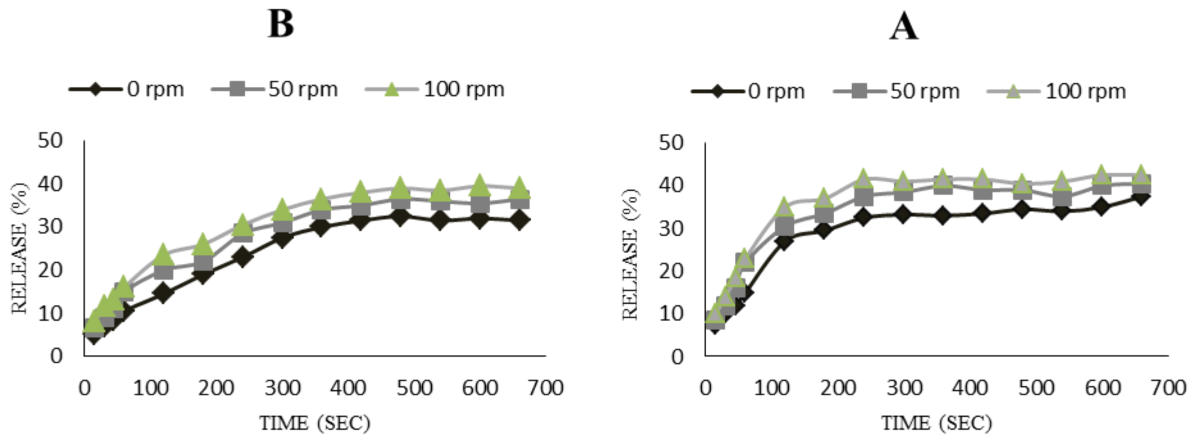
شکل ۴- طیف‌های FTIR مواد اولیه میکروکپسول (لیمونن، ایزوله پروتئین سویا SPI، نشاسته اصلاح‌شده OSA) و میکروکپسول‌های دو و شش لایه

Fig. 4- FTIR spectra of microcapsule raw materials (limonene, soy protein isolate SPI, modified starch OSA) and two- and six-layer microcapsules

بررسی رهایش از میکروکپسول‌های دو و شش لایه محتوی لیمونن

میزان رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه به‌عنوان تابعی از زمان در شکل ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش تعداد لایه‌ها، زمان رهایش لیمونن افزایش یافت. در میکروکپسول‌های دو لایه نسبت به شش لایه زمان رهایش حداکثری بیشتر بود که به دلیل افزایش لایه‌ها، حفرات و شکستگی در سطح میکروکپسول‌ها کاهش یافته و پوشش دهی منسجم‌تری اطراف قطرات لیمونن شکل می‌گیرد که منجر به کاهش سرعت انتقال آن به خارج از میکروکپسول می‌شود.

در شکل B و 5A پروفایل رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه به‌صورت تابعی از تنش برشی محیط رهایش در شرایط دهان مصنوعی نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که اعمال تنش برشی، سرعت رهایش لیمونن افزایش می‌یابد. تنش برشی اعمال شده همانند یک نیروی فشاری عمل می‌کند و منجر به خروج لیمونن از منافذ میکروکپسول‌ها می‌شود. همچنین این تنش برشی باعث تخریب برخی از میکروکپسول‌ها شد و میزان انتشار لیمونن به محیط افزایش می‌یابد. انصاری فر و همکاران (Ansarifar *et al.*, 2017) محبی و همکاران (Mohebbi *et al.*, 2019) زندی و همکاران (Zandi *et al.*, 2014) و ون راث و روژن (Van Ruth and Roozen, 2000) گزارش نمودند که با افزایش نیروی برشی دهانی، سبب افزایش سرعت رهایش آروما و مزه از ماتریکس کپسوله کننده می‌گردد.



شکل ۵- پروفایل رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های A: دو لایه و B: شش لایه به‌عنوان تابعی از زمان رهایش تحت تأثیر تنش‌های برشی مختلف

Fig. 5- Limonene release profile from microcapsules A: two layers and B: six layers as a function of release time under the influence of different shear stresses

جدول ۱- پارامترهای حاصل از برازش مدل‌های مختلف بر نتایج تجربی برای میکروکپسول‌های چند لایه

Table 1- Parameters obtained from fitting different models on experimental results of multilayer microcapsules

Layers of microcapsule	Chewing rate	Zero-order K	Zero-order R^2	First order K	First order R^2	Korsemeyer –Peppas n	Korsemeyer –Peppas K	Korsemeyer –Peppas R^2	Higuchi K	Higuchi R^2
	0	0.391	0.92	0.0345	0.97	0.220	0.687	0.96	0491	0.92
L2	50	0.437	0.87	0.0413	0.96	0.268	0.702	0.92	0.628	0.83
	100	0.461	0.86	0.0457	0.95	0.313	0.863	0.91	0.712	0.88
	0	0.214	0.75	0.0192	0.92	0.324	0.456	0.92	0.243	0.89
L6	50	0.253	0.79	0.0253	0.98	0.359	0.523	0.91	0.312	0.77
	100	0.286	0.81	0.0302	0.97	0.363	0.571	0.93	0.421	0.86

مدل‌های رهایش و بررسی ضریب نفوذ

برای بررسی مکانیسم رهایش لیمونن از میکرو کپسول‌های دو و شش لایه، مدل‌های ریاضی سینتیکی مختلفی با داده‌های تجربی رهایش لیمونن از میکروکپسول‌ها، برازش شد. پارامترهای حاصل از مدل‌های تجربی درجه صفر، درجه یک، کورسمیر-پپاس و هیگوچی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد مدل کینتیکی درجه اول بهترین توصیف را برای رهایش لیمونن از کپسول‌های دو و شش لایه در شرایط مختلف را داشت.

پارامتر n که توان موجود در رابطه کورسمیر-پپاس بوده به‌عنوان شاخصی از مکانیسم رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های چند لایه، محاسبه شد. نتایج حاصل از برازش داده‌های رهایش لیمونن نشان داد که این شاخص در محدوده بین ۰/۲۲ تا ۰/۳۶ قرار گرفته که نشان‌دهنده این است که رهایش بر اساس مکانیسم نفوذ فیک[1] رخ داده، این نوع رهایش به‌عنوان مکانیسم اصلی در رهایش لیمونن از میکروکپسول‌ها است (جدول ۱).

همان‌طور که گفته شد برای محاسبه ضریب نفوذ از مدل ارائه شده توسط سیپمان و همکاران (Siepmann *et al.*, 2013) که برآمده از قانون فیک برای فرایندهایی با مدت زمان کوتاه و شرایطی که رهایش ترکیبات ریز پوشانی شده کمتر از ۴۰ درصد باشد، استفاده شد (معادله ۶). جدول ۲ مقدار ضریب نفوذ را برای فرآیند رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه را در شرایط نیروی برشی ۰، ۵۰ و ۱۰۰S^{-1} نشان می‌دهد. نتایج نشان داد میکروکپسول‌های شش لایه نسبت به میکروکپسول‌های دو لایه دارای ضریب نفوذ کمتری می‌باشند درنتیجه باعث سرعت رهایش لیمونن کمتر می‌شود. این امر احتمالاً به دلیل افزایش ضخامت پوسته میکروکپسول شش لایه و همچنین پوشش نشاسته اصلاح‌شده اطراف پوسته‌ها است که باعث کاهش سرعت انتشار لیمونن از میکروکپسول‌های شش لایه می‌شود. با افزایش نیروی برشی، ضریب نفوذ افزایش یافته و در

1- Fickian diffusional

نتیجه سرعت رهایش در میکروکپسول‌های دو و شش لایه افزوده می‌شود. تنش برشی به‌عنوان یک نیروی فشاری باعث این افزایش سرعت رهایش می‌شود. همچنین این تنش به تخریب میکروکپسول‌ها کمک کرده در نتیجه سبب افزایش میزان انتشار لیمونن به محیط نیز می‌شود.

جدول ۲- ضریب نفوذپذیری برای رهایش لیمونن از میکروکپسول چند لایه در نیروی برشی مختلف

Table 2- Diffusion coefficient for the release of limonene from multilayered microcapsules at different shear rates

	Shear rate (S^{-1})	Two layers (L_2)	Six layers (L_6)
Diffusion coefficient (cm^2/s)	0	4.125×10^{-9}	8.465×10^{-10}
	50	8.995×10^{-9}	4.362×10^{-9}
	100	2.114×10^{-8}	6.682×10^{-9}

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد از روش لایه به لایه می‌توان برای تولید میکروکپسول‌های لیمونن استفاده کرد. ایزوله پروتئین سویا و نشاسته اصلاح‌شده به‌خوبی توانایی پوشش دهی قطرات لیمونن را دارند. تصاویر SEM به‌خوبی نشان داد که ساختار میکروکپسول‌های شش لایه فاقد ترک‌خوردگی و حفرات بوده و سطح یکنواخت‌تری نسبت به میکروکپسول‌های دو لایه دارد.

به‌منظور بررسی مکانیسم رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه، از مدل‌های کینتیکی مختلف برای برازش داده‌های تجربی رهایش استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که رهایش از این میکروکپسول‌ها بر اساس مکانیسم نفوذ و قانون فیک رخ داده است که به‌عنوان اصلی‌ترین مکانیسم انتقال جرم در فرایند رهایش است. هم‌چنین نتایج بررسی رهایش میکروکپسول‌های دو و شش لایه نشان داد که میکروکپسول‌های شش لایه نسبت به میکروکپسول‌های دو لایه دارای ضریب نفوذ کمتری بودند، پس در شرایط یکسان تنش برشی، سرعت رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های شش لایه کمتر از میکروکپسول‌ها دو لایه بوده که این امر به دلیل تکرار پوشش ایزوله پروتئین سویا و نشاسته اصلاح‌شده اطراف میکروکپسول و افزایش ضخامت دیواره‌ها است که باعث کاهش سرعت انتشار لیمونن از میکروکپسول‌های شش لایه می‌شود.

سپاسگزاری

مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۳/۴۵۰۲۷ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد همچنین معاونت پژوهش و فناوری دانشکده کشاورزی به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Ansarifar, E., Mohebbi, M., Shahidi, F., Koocheki, A., & Ramezanian, N. (2017). Novel multilayer microcapsules based on soy protein isolate fibrils and high methoxyl pectin: Production, characterization and release modeling. *International Journal of Biological Macromolecules* 97: 761-769. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.056.
2. Ansarifar, E., Shahidi, F., Mohebbi, M., Koocheki, A., & Ramazanian, N. (2017). Investigation of multilayer microcapsules based on electrostatic adsorption of soy protein isolated fibrils and high methoxyl pectin containing diacetyl. *Iranian Journal Food Science and Technology Research 13*(4): 553-565 .
3. Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm 67*(3): 217-223 .
4. Decher, G., & Hong, J. (1991). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: II. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie 95*(11): 1430-1434. https://doi.org/10.1002/bbpc.19910951122.
5. Decher, G., & Schlenoff, J.B. (2006). *Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials*: John Wiley & Sons.
6. Dokić, L., Krstonošić, V., & Nikolić, I. (2012). Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch. *Food Hydrocolloids 29*(1): 185-192. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.008.
7. Elzoghby, A.O., Samy, W.M., & Elgindy, N.A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release 157*(2): 168-182. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.008.

8. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International 40*(9): 1107-1121. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004.
9. Gunning, Y.M., Gunning, P.A., Kemsley, E.K., Parker, R., Ring, S.G., Wilson, R.H., & Blake, A. (1999). Factors affecting the release of flavor encapsulated in carbohydrate matrixes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 47*(12): 5198-5205 . https://doi.org/10.1021/jf990039r.
10. Güzey, D., & McClements, D.J. (2006). Influence of environmental stresses on O/W emulsions stabilized by β-lactoglobulin–pectin and β-lactoglobulin–pectin–chitosan membranes produced by the electrostatic layer-by-layer deposition technique. *Food Biophysics 1*(1): 30-40. https://doi.org/10.1007/s11483-005-9002-z.
11. Huang, G.-Q ,.Sun, Y.-T., Xiao, J.-X., & Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry 135*(2): 534-539. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.140
12. Humblet-Hua, K., Scheltens, G., Van Der Linden, E., & Sagis, L. (2011). Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids 25*(4): 569-576. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.003.
13. Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying technology 26*(7): 816-835. https://doi.org/10.1080/07373930802135972.
14. Luo, F.-x., Huang, Q., Fu, X., Zhang, L.-x., & Yu, S.-j. (2009). Preparation and characterisation of crosslinked waxy potato starch. *Food Chemistry 115*(2): 563-568. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.052.
15. McClements, D.J. (2005). Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. *Langmuir 21*(21): 9777-9785. https://doi.org/10.1021/la0512603.
16. Mendanha, D.V., Ortiz, S.E.M., Favaro-Trindade, C.S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E.S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International 42*(8): 1099-1104. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007.
17. Mohebbi, M., Varidi, M., Noshad, M., & Khalilian Movahhed, M. (2019). Evaluation of the Release of Microcapsulated Vanillin under Simulated Oral Conditions. *Research and Innovation in Food Science and Technology 8*(2): 111-124. https://doi.org/10.22101/JRIFST.2019.07.22.821.
18. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1*:* 1806-1815. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265.
19. Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F,. & Durrieu, V. (2012). Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α-Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International 48*(2): 387-396. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.023.
20. Nilsson, L., & Bergenståhl, B. (2007). Adsorption of hydrophobically modified anionic starch at oppositely charged oil/water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science 308*(2): 508-513. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.01.024.
21. Noshad, M., Mohebbi, M., Koocheki, A., & Shahidi, F. (2016). Influence of interfacial engineering on stability of emulsions stabilized with soy protein isolate. *Journal of Dispersion Science and Technology 37*(1): 56-65. https://doi.org/10.1080/01932691.2015.1027907.
22. Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F., & Koocheki, A. (2015). Effect of layer-by-layer polyelectrolyte method on encapsulation of vanillin. *International Journal of Biological Macromolecules* 81: 803-808. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.012.
23. Peyratout, C.S., & Daehne, L. (2004). Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: from multilayers to smart containers. *Angewandte Chemie International Edition 43*(29): 3762-3783. https://doi.org/10.1002/anie.200300568.
24. Qiu, X., Leporatti, S., Donath, E., & Möhwald, H. (2001). Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir 17*(17): 5375-5380. https://doi.org/10.1021/la010201w.
25. Rodríguez, S.D., Wilderjans, T., Sosa, N., & Bernik, D.L. (2013). Image texture analysis and gas sensor array studies applied to vanilla encapsulation by octenyl succinic anhydride starches. *Journal of Food Research 2*(2): 36-48. https://doi.org/10.5539/jfr.v2n2p36.
26. Roesch, R., & Corredig, M. (2002). Characterization of oil-in-water emulsions prepared with commercial soy protein concentrate. *Journal of Food Science 67*(8): 2837-2842. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08825.x.
27. Sagis, L.M., de Ruiter, R., Miranda, F.J.R., de Ruiter, J., Schroën, K., van Aelst, A. C., van der Linden, E. (2008). Polymer microcapsules with a fiber-reinforced nanocomposite shell. *Langmuir 24*(5): 1608-1612. https://doi.org/10.1021/la7032115.

28. Siepmann, J., Siegel, R.A., & Siepmann, F. (2012). *Diffusion controlled drug delivery systems. In Fundamentals and applications of controlled release drug delivery* (pp. 127-152): Springer. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.006.
29. Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics 364*(2): 328-343. https://doi.org/j.ijpharm.2008.09.004.
30. Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003). Microencapsulation by spray drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Journal of Food Science 68*(7): 2256-2262. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05756.x.
31. Tesch, S., Gerhards, C., & Schubert, H. (2002). Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal of Food Engineering 54*(2): 167-174. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00206-0.
32. Van Ruth, S., & Roozen, J. (2000). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chemistry 71*(3): 339-345. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00186-2.
33. Wang, J.-M., Yang, X.-Q., Yin, S.-W., Yuan, D.-B., Xia, N., & Qi, J.-R. (2011). Growth kinetics of amyloid-like fibrils derived from individual subunits of soy β-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 59*(20): 11270-11277. https://doi.org/10.1021/jf202541m.
34. Ye, S., Wang, C., Liu, X., & Tong, Z. (2005). Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 16*(7): 909-923. https://doi.org/10.1163/1568562054255691.
35. Yow, H.N., & Routh, A.F. (2006). Formation of liquid core–polymer shell microcapsules. *Soft Matter 2*(11): 940-949. https://doi.org/10.1039/B606965G.
36. Zandi, M., Mohebbi, M., Varidi, M., & Ramezanian, N. (2014). Evaluation of diacetyl encapsulated alginate–whey protein microspheres release kinetics and mechanism at simulated mouth conditions. *Food Research International* 56: 211-217. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.035.
37. Zuidam, N.J., & Nedovic, V. (2010). *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Springer New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0.